

# 植物内生细菌 XG32 菌株 16S rRNA 寡核苷酸 探针杂交条件优化和特异性验证

刘 佳, 王梅霞, 闫淑珍, 陈双林

(南京师范大学生命科学学院 江苏省微生物工程技术研究中心, 江苏 南京 210046)

[摘要] 为了能利用荧光原位杂交方法来研究植物内生细菌 XG32 菌株在植物体内的定殖和分布, 利用 XG32 菌株的 16S rRNA 中段特异性序列和 Genbank 数据库, 用 BLAST、DNA club 和 Oligo 软件设计了一个在理论上具有特异性的探针, 在优化该探针的杂交条件基础上, 通过与 12 个亲缘关系相邻和相近的菌株反复杂交来验证探针的特异性. 结果显示, XG32 探针适宜的杂交条件为: 杂交缓冲液中甲酰胺浓度为 35%, NaCl 浓度为 1.2 mol/L, 杂交温度为 42℃, 清洗缓冲液中 NaCl 浓度为 0.02 mol/L; 探针与 XG32 菌株杂交信号明显, 与其他菌株均不能杂交. 综上所述, 设计的探针是 XG32 菌株的特异性探针.

[关键词] 荧光原位杂交, 杂交条件优化, 特异探针验证

[中图分类号] Q938.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2011)01-0089-07

## Optimization of Hybridization Conditions and Specific Verification for 16S rRNA Oligonucleotide Probe of Endophytic Bacteria Strain XG32

Liu Jia Wang Meixia Yan Shuzhen Chen Shuanglin

(Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, School of Life Sciences,  
Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract** Fluorescence in situ hybridization was applied to investigate the cloning and distribution of the endophytic bacteria strain XG32 with the role of growth-promoting and disease control in plants. Firstly, a specific probe was designed theoretically at the base on the mid-specific sequence of the 16S rRNA of the strain XG32 with the GenBank database, BLAST program, DNA club software and Oligo software. Secondly, 12 strains which similar or adjacent to the strain XG32 were used to certify the specificity of the probe by repeated hybridization in the basis of the suitable conditions of hybridization. The results indicated that appropriate conditions for hybridization of the probe were 35% formamide and 1.2 mol/L NaCl in hybridization buffer, 42℃ hybridization temperature, 0.02 mol/L NaCl in washing buffer. The hybridization signal was clear between the probe XG32 and the strain XG32. To sum up, the probe XG32 was the specific probe of the strain XG32.

**Key words** fluorescence in situ hybridization, optimization of the hybridization conditions, verification of specific probe

植物内生细菌 XG32 分离自番茄根际, 经鉴定为 *Pseudomonas fluorescens* N<sup>[1]</sup>. 该菌广泛分布于植物根内, 对植物具有明显的促生作用<sup>[2]</sup>. 经拮抗实验、室内人工接种和田间小区试验证实, 该菌对辣椒疫霉具有明显的拮抗作用, 其菌剂可有效地防治辣椒疫霉病<sup>[3]</sup>.

在植物体内生活着许多内生细菌, 这些内生细菌能产生多种生物学作用, 如提供植物所需要的营养物质, 参与植物的防卫功能, 促进植物快速生长, 增强植物抗逆境、抗病害、抗动物危害的能力等<sup>[4, 5]</sup>. 植物内生细菌与植物体之间渐渐形成了一种和谐联合的互利共栖关系. 对于植物内生细菌与植物和谐联合作用研究, 其核心问题在于揭示内生细菌对植物侵染、定殖的机制. 尤其是对生防内生细菌而言, 明确其侵染定殖规律对于相关菌剂的开发与应用至关重要.

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目 (07KJB180063).

通讯联系人: 闫淑珍, 副教授, 研究方向: 微生物的应用. E-mail: yanshuzhen@njnu.edu.cn

20世纪80年代以来,一些先进的技术手段如抗利福平、氨苄青霉素、卡那霉素等抗生素标记法<sup>[6]</sup>,免疫技术结合电子显微镜技术<sup>[7]</sup>和分子生物学技术<sup>[8]</sup>被应用于内生细菌的检测。在抗生素标记中以抗利福平标记为主,该法不易丧失其生防性状。吴蔼民等<sup>[9]</sup>用抗利福平标记法,对来自棉花的内生菌73a在不同抗性棉花品种体内的定殖消长动态进行了研究。在免疫技术方面,电镜水平的免疫金染色是目前较理想的免疫定位方法。刘云霞等<sup>[10]</sup>用电镜免疫胶体金方法研究了水稻内生细菌的定位。绿色荧光蛋白(GFP)被认为是当前用于分子生态学研究中最理想的报告基因。冯娜等<sup>[11]</sup>利用gfp基因检测了豆根瘤菌在饭豆根部的定殖动态。

荧光原位杂交技术同样也被广泛应用于微生物生态学研究。荧光原位杂交(Fluorescent in Situ Hybridization, FISH)是利用荧光标记的特异核酸探针与细胞内相应的靶DNA分子或RNA分子杂交,通过在荧光显微镜或共聚焦激光扫描仪下观察荧光信号,来确定与特异探针杂交后被染色的细胞或细胞器的形态和分布,或者是结合了荧光探针的DNA区域或RNA分子在染色体或其他细胞器中的定位。在植物内生菌的研究中,由于FISH探针可以特定地与菌株结合发出荧光信号,进而检测其定位、数量以及与其他菌株进行区分,因此FISH技术已越来越多地被用来检测植物内生菌的研究。Stefan Kutter等<sup>[12]</sup>利用FISH技术检测了沙门氏菌在大麦根部的定殖,表明沙门氏菌在根毛和根表皮的密度很高,而且可扩散到下方的皮层。Sandra Lo Piccolo等<sup>[13]</sup>利用FISH以及激光共聚焦技术,使用细菌通用探针EUB338原位检测了葡萄叶片内生细菌的空间分布。本文利用XG32菌株的16S rRNA中段特异性序列,设计相应的寡核苷酸探针,并对其进行特异性验证以及杂交条件优化,为进一步利用探针检测植物内生细菌XG32在植物体内的分布和空间位置的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 探针

细菌通用探针EUB338(5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')<sup>[14]</sup>。

XG32特异性探针(5'-TCAAGAGGAGCAAGCACCTCTCTA-3'),设计方法是:从Genbank中调取假单胞菌属各种代表菌株的16S rRNA序列,以及非本属的序列,连同XG32序列利用Clustal软件进行比对,从比对结果中找出XG32序列的特异区域,选取20~30 bp设计探针,然后将设计的探针重新在NCBI中进行BLAST比对,选取与16S rDNA BLAST比对结果一致的探针,再用DNA club软件和Oligo软件对探针进行评估,以验证探针的可用性。合成探针时,在探针的5'端用异硫氰酸荧光素(FITC)标记。经序列比对及软件分析,探针XG32理论上是特异的,其 $T_m$ 值为70℃,G+C含量为50%。

以上两种探针用Tris-EDTA溶解,保存浓度为50 ng/μL<sup>[15]</sup>。

### 1.2 探针杂交条件优化

首先检测细菌菌株的自发荧光,对照采用通用探针EUB338

#### 1.2.1 载玻片的预处理

载玻片须先经洗衣粉或者洗涤剂清洗,去除载玻片上的杂物,然后用1%的盐酸浸泡24 h,取出后先用蒸馏水冲洗3~4次,然后用双蒸水冲洗2~3次,自然晾干。

称取0.5%的明胶在70℃的水中溶解,冷至室温,加入0.05%的 $\text{CaK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,完全溶解后,在冰浴中冷却。将处理好的载玻片浸入到上述明胶液中,取出风干,放入标本盒中保存。

细菌菌体的固定方法参照文献[16]。

#### 1.2.2 荧光原位杂交步骤

取10 μL适当浓度稀释的固定菌体悬液于载玻片中央,自然风干。分别用50%、80%、96%乙醇依次脱水3 min,风干后,加入1 g/L溶菌酶40 μL,置于37℃培养箱中20 min,无菌去离子水冲洗,以除去溶菌酶,自然风干。再加入1 mol/L HCl 40 μL,置于37℃培养箱中20 min,无菌去离子水冲洗,自然风干。加入 $2 \times \text{SSC}$  40 μL,置于37℃培养箱中30 min,无菌去离子水冲洗,自然风干。用50%、80%、96%乙醇依次脱水3 min,自然风干。取一平皿,将浸有杂交缓冲液(不同浓度的NaCl 0.02 mol/L Tris-HCl(pH 7.2), 0.1% SDS<sup>[17]</sup>,不同浓度的甲酰胺)的滤纸片铺于平皿内,将上述载玻片放于平皿内,样品加入10 μL杂交溶液(取1 μL探针溶液加入99 μL杂交缓冲液,使杂交缓冲液中的探针浓度达到0.5 ng/μL),用锡箔纸包裹平

皿后,放入培养箱中, 42℃避光杂交 3 h 杂交结束后,用 46℃预热的清洗缓冲液(不同浓度的 NaCl 0.02 mol/L Tris-HCl(pH 7.6), 0.005 mol/L EDTA(pH 8.0), 0.01% SDS), 46℃清洗 30 min 然后用无菌去离子水冲洗,自然风干.立即置于荧光显微镜下观察.

1.2.3 杂交条件优化

以细菌通用探针 EUB338的杂交条件作为基准,对设计的探针在 4个方面进行杂交条件优化.选择的杂交温度是 40℃、42℃、44℃、46℃、48℃和 50℃;选择的杂交缓冲液甲酰胺浓度是 25%、30%、35%、40%、45%、50%;选择的杂交缓冲液 NaCl浓度是 0.2 mol/L、0.5 mol/L、0.9 mol/L、1.2 mol/L、1.5 mol/L和 2 mol/L;选择的清洗缓冲液 NaCl浓度是 0.02 mol/L、0.04 mol/L、0.06 mol/L、0.08 mol/L、0.1 mol/L、0.15 mol/L 重复 3次.

1.3 探针特异性的验证

XG32菌株经鉴定是 *Pseudomonas fluorescens* bi-ovar IV<sup>[1]</sup>. 验证菌株见表 1,选择方法是种内一株,属内 2株,其余菌株为相邻和相近的各属中一个代表种,无自发荧光的菌株.

2 结果与分析

2.1 XG32特异探针杂交条件优化

2.1.1 菌体自发荧光的检测

菌体的自发荧光实验证实,荧光假单胞菌 XG32在荧光显微镜下无自发荧光.见图 1.

2.1.2 杂交温度的优化

在 42℃时,菌体荧光信号较为清晰. 40℃时,背景荧光较强,视野内较为模糊,菌体荧光很弱,可能是由于杂交温度较低,探针和不完全配对的核酸序列形成杂交体的机率高,使背景内出现的荧光信号较多,故而视野比较模糊.温度上升至 42℃以上时,检测到的荧光信号减弱,推断杂交温度较高,菌体的结构受到一定的破坏,杂交不完全,探针与菌体不能很好地结合.因此认为 42℃为 XG32 探针的适宜杂交温度.

2.1.3 杂交缓冲液中甲酰胺浓度的优化

甲酰胺浓度为 35% 时,菌体荧光信号最为强烈,且与背景荧光对比度高,可以明显区分.甲酰胺浓度低于 35% 时,菌体荧光灯,高于 35% 时,背景荧光强烈,与菌体荧光对比度弱,不能明显区别.因此认为杂交缓冲液中甲酰胺浓度为 35% 时最适.

2.1.4 杂交缓冲液中 NaCl浓度的优化

NaCl浓度为 1.2 mol/L时,菌体荧光信号强烈,背景荧光较弱,可清晰地区别. NaCl浓度为 0.2 mol/L时,菌体荧光信号弱,且出现荧光的菌体数量少. NaCl浓度为 2 mol/L时,背景荧光较强,杂质荧光亮,分析可能是在高盐状态下,错误配对的杂交体较为稳定,荧光信号多,致使背景较杂乱.因此认为杂交缓冲液中 NaCl浓度为 1.2 mol/L时最适.

2.1.5 清洗缓冲液中 NaCl浓度的优化

NaCl浓度为 0.02 mol/L时,分散的单个菌体,几乎均可看到荧光信号,背景荧光灯,可摆脱背景荧光的干扰,推断可能是因为清洗缓冲液中 NaCl浓度低,使非特异性杂交体减少,提高了杂交的特异性,明显降低了背景染色.随着 NaCl浓度逐渐升高,菌体的荧光逐渐减弱,背景的荧光逐渐增强,背景干扰很大.因此认为清洗缓冲液中 NaCl浓度为 0.02 mol/L时最适.

表 1 XG32探针特异性验证中选用的菌株  
Table 1 Strains used in probe specificity verification

菌株编号(或登录号)	拉丁学名
DLJ1(FJ407181)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar I
CGMCC1.872	<i>Pseudomonas putida</i>
CGMCC1.1785	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CGMCC1.1813	<i>Burkholderia cepacia</i>
CGMCC1.58	<i>Enterobacter cloacae</i>
CGMCC1.927	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
CGMCC1.364	<i>Escherichia coli</i>
CGMCC1.940	<i>Bacillus pumilus</i>
CGMCC1.941	<i>Bacillus megaterium</i>
CGMCC1.1552	<i>Salmonella</i> sp.
CGMCC1.879	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
CGMCC1.1000	<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>carotovora</i>

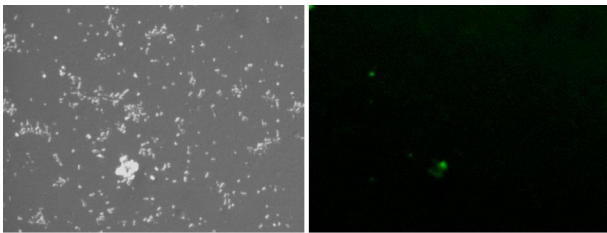


图 1 *Pseudomonas fluorescens* XG32 透过(左)及自发荧光(右)照片.(放大倍数均为 10×20)

Fig.1 Bright-field image(left) and autofluorescence image(right) of *Pseudomonas fluorescens* XG32. (10×20 times)

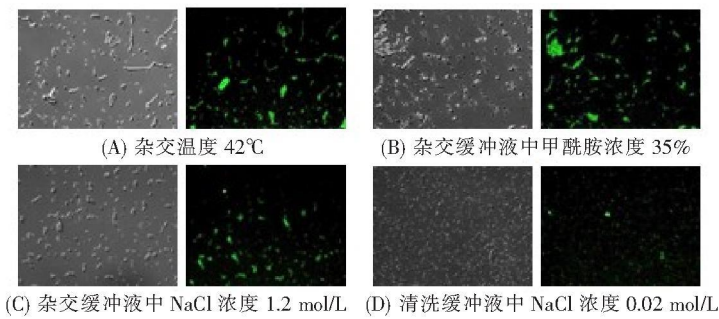


图 2 XG32 特异探针在不同条件下杂交的透过(左)及荧光(右)照片.(10×20)

Fig.2 Bright-field image(left) and fluorescence image(right) of *Pseudomonas fluorescens* XG32 hybridized with the probe XG32 in different conditions. (10×20)

2.2 探针特异性的验证

设计的探针与 XG32 菌株杂交信号明显,而选用的 12 株代表性的标准菌株所有菌株与设计的探针杂交均无荧光信号,但与通用探针 EUB338 杂交时均有荧光信号.由此可以初步确定 XG32 探针对菌株 XG32 是特异的.部分菌株与通用探针 EUB338 及与探针 XG32 杂交情况如图 3 所示.

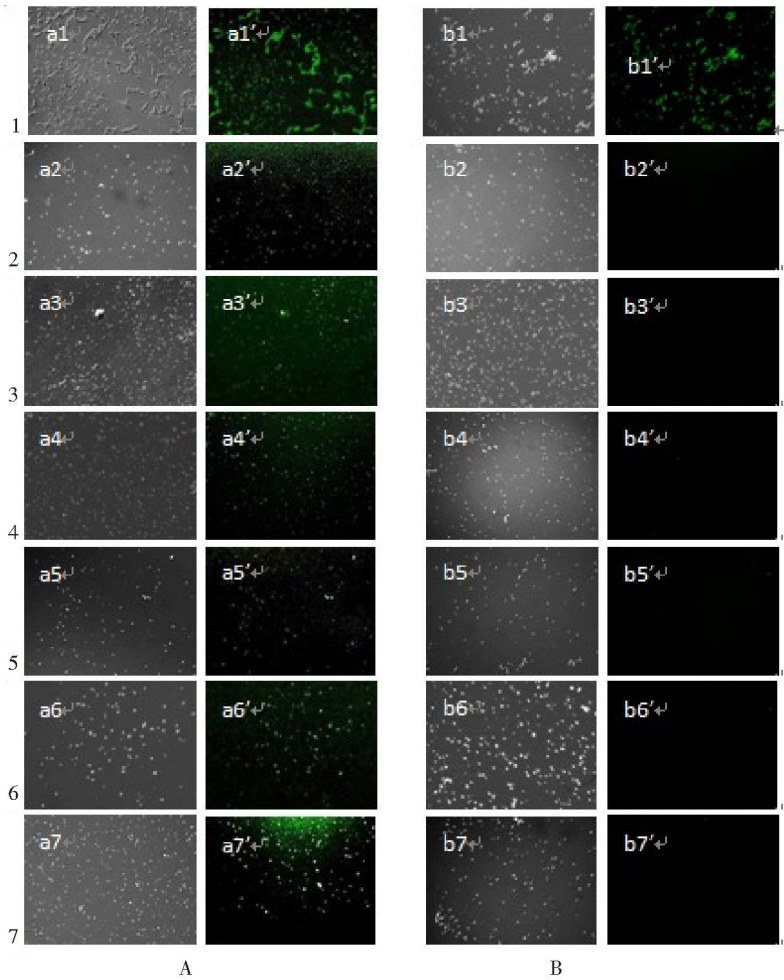


图 3 (A)探针 EUB338 与部分菌株杂交后的透过(左)及荧光(右)照片.(B)探针 XG32 与部分菌株杂交后的透过(左)及荧光(右)照片.菌株依次为 1 *Pseudomonas fluorescens* XG32, 2 *Pseudomonas fluorescens* biovar IDLJ1, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *pseudomonas cepacia*, 5 *Aeromonas hydrophila* subsp. *Hydrophila*, 6 *Bacillus pumilus*, 7 *Erwinia carotovora* var. *carotovora*. (10×20)

Fig 3 (A) Bright-field image( left) and fluorescence image( right) of some strains hybridized with the universal bacterial probe EUB338. (B) Bright-field image( left) and fluorescence image( right) of some strains hybridized with the probe XG32. Strains were 1 *Pseudomonas fluorescens* XG32, 2 *Pseudomonas fluorescens* biovar IDLJ1, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *pseudomonas cepacia*, 5 *Aeromonas hydrophila* subsp. *Hydrophila*, 6 *Bacillus pumilus*, 7 *Erwinia carotovora* var. *carotovora*. (10×20)

### 3 讨论

目前 FISH 中使用的寡核苷酸探针主要依据 16S rRNA 分子的核苷酸序列来设计. 探针长度一般为 15 ~ 30 个碱基, 通常在 5'端通过共价键与简单荧光染料相连. 本文设计的 XG32 探针为 24 个碱基, 标记绿色的 FITC 染料后能顺利地进入菌体内, 使菌体呈现绿色, 在荧光显微镜下信号比较明显.

FISH 检测的精确性和可靠性依赖于探针的特异性, 由于所采用的寡核苷酸探针一般在 30 个碱基以下, 不适宜的杂交条件会导致碱基错配, 一个碱基的错配足以鉴别不同的微生物细胞, 这样, 序列相近的细菌会被检测出来, 导致特异性降低. 因此探针的杂交方法和条件选择很重要.

影响荧光原位杂交的因素很多, 其中包括溶菌酶处理时间、HCl 处理时间、杂交时间、杂交温度、杂交缓冲液中重要成分的浓度以及清洗缓冲液中盐浓度等. 在杂交过程中, 溶菌酶可破坏细菌的细胞壁, 使之松弛从而让探针更易进入. HCl 同样作用于细菌细胞壁, 使探针更易进入菌体, 而且还可减少探针非特异性吸收的背景荧光及杂质产生的荧光<sup>[18]</sup>. XG32 为荧光假单胞菌, 属于革兰氏阴性菌, 其细胞壁较薄, 细胞渗透性好, 探针较容易进入菌体内. 因此, 溶菌酶处理和 HCl 处理时间无需太长, 20 min 即可. 从理论上讲, 核苷酸杂交的有效时间是 3 h 左右. 本试验选择的杂交条件时间为 3 h, 通过实验证实其较为适宜. 所以, 针对以上这 3 个条件, XG32 探针无需进行优化, 直接应用于试验即可. 但是针对 4 个重要条件: 即杂交温度、杂交缓冲液中甲酰胺的浓度、杂交缓冲液中 NaCl 的浓度以及清洗缓冲液中 NaCl 的浓度, 不同的探针所需的杂交条件是不一样的, 因此探针使用前需要对这 4 个条件进行优化.

杂交效果与杂交的严格度有关. 杂交的严格度是指通过杂交及冲洗条件的选择对完全配对及不完全配对杂交体的鉴别程度. 影响严格度最重要的因素是杂交温度, 而杂交温度又与双股核酸的解离温度 (melting temperature  $T_m$ ) 有密切关系<sup>[19]</sup>. 杂交体  $T_m$  值每下降 1.2℃, 100 个碱基对中便会产生一个错误配对, 所以想要有好的特异性及高严格度, 理论上杂交温度应该要尽量和探针与目标核酸序列的  $T_m$  接近, 一般是在低于  $T_m$  5℃之范围, 此时有良好的严格度和杂交效率<sup>[20]</sup>. 原位杂交中, 多数 RNA 探针需要的  $T_m$  值是 95℃. 过高的杂交温度会使载玻片上已固定的样本受到破坏, 对保持组织形态完整和组织黏附在载玻片上是不可能的. 因此一般原位杂交均将温度降至 46℃进行<sup>[21]</sup>. XG32 探针杂交温度的优化结果表明 42℃为最佳的杂交温度, 该温度既可以减弱背景荧光, 使菌体荧光突出, 也不破坏菌体的结构, 使探针与菌体结合较好, 菌体荧光清晰明显.

甲酰胺可以使核酸互补配对碱基间氢键的键结力量减弱, 降低双股核酸的  $T_m$ ; 一般每增加 1% 的甲酰胺, DNA/DNA 或 DNA/RNA 双链的  $T_m$  值减少 0.72℃<sup>[22]</sup>. 因此, 杂交过程中常规要加入一定浓度的甲酰胺于杂交缓冲液中以降低杂交体的  $T_m$  值. XG32 探针的  $T_m$  值是 70℃, 按照这个计算标准, 如果杂交温度选择 46℃, 添加甲酰胺的浓度为 33.3%. 而且, 由于甲酰胺具有一定毒性, 所以其浓度也不宜过高. 试验结果表明, 杂交缓冲液中甲酰胺浓度为 35% 时, 杂交效果最佳, 菌体荧光强烈, 与较弱的背景荧光可以明显地区分.

杂交严格度还可以由改变杂交缓冲液中盐类浓度来调整. 在高盐类浓度的条件下, 错误配对的杂交体会比在低盐类浓度下稳定, 严格度亦低<sup>[22]</sup>. 也就是说, 杂交缓冲液中盐类应该选择较低的浓度, 以使错误配对的杂交体尽可能少, 提高杂交的严格度. 细菌通用探针 EUB338 杂交时, 杂交缓冲液中 NaCl 浓度为 0.9 mol/L, 因此, 以 0.9 mol/L 为基准, 选择了 6 种 NaCl 浓度进行优化试验. 试验结果表明, 杂交缓冲液中 NaCl 的最佳浓度为 1.2 mol/L. 该浓度条件下, 错配的碱基数目少或者说错配碱基不稳定, 导致背景荧光较弱, 而且菌体荧光较强, 使杂交信号最为清晰.

杂交后需要用清洗缓冲液对样本进行洗涤, 其目的是为了洗去未杂交和错误配对的探针<sup>[19]</sup>. RNA 探针杂交时产生的背景染色特别高, 但能通过杂交后的洗涤降低背景染色并获得较好的反差效果. 因甲酰胺具有毒性, 不宜大量使用, 相较于杂交过程, 清洗时使用的溶液量较多, 故可以用降低清洗液盐类浓度的方式取代甲酰胺的添加, 减弱非特异性杂交体的形成, 提高杂交的特异性, 以维持其严格度<sup>[23]</sup>. 因此, 理论上清洗缓冲液中盐浓度应该尽量低, 以通过清洗去除不必要的背景荧光, 提高目标菌体的荧光. XG32 探针清洗缓冲液中 NaCl 浓度为 0.02 mol/L 时, 菌体荧光最强, 背景荧光最弱, 二者反差最为明显, 菌体荧光非常突出, 这与理论也是一致的, 因此, 该浓度是最优的.



本试验中选择的4个优化条件,目的一致,均为降低探针的 $T_m$ 值,在较低的杂交温度下维持杂交的高严格度.从理论上说,在高温、高甲酰胺浓度和低盐类浓度下进行杂交,在低盐类浓度下进行清洗,会出现高严格度的结果<sup>[11]</sup>.从最佳优化条件的图片对应的数据来分析,试验中确定的4种最佳的杂交条件与理论是基本相符的,进一步证明了试验中优化的结果是正确的.

探针的特异性验证中菌株的选择非常重要.因为设计探针时选用的是16S rRNA的非严格保守核苷酸序列,单纯以探针的序列进行比对,只能基本确定该探针是特异的.理论上应该将探针与所有的细菌菌株全部杂交后,才能验证该探针的特异性.但是在实际的试验中是不可能实施的,因此选择验证的菌株要有一定的代表性.在选择验证的菌株中必须包括与该菌株亲缘关系最近种内的菌株及属内的菌株,还要选择属外的有代表性的标准菌种.另一方面,某些具有自发荧光的微生物也会干扰最终检测结果的精确性.所以验证菌株的选择还应以该菌株没有自发荧光为准.试验中XG32菌株的分类地位是*Pseudomonas fluorescens* biova IV,所以选择与该菌株同种的一株*Pseudomonas fluorescens* biova I以及假单胞菌属以及属外的一些没有自发荧光的菌株进行特异性验证.由于选择菌株的数量有限,仅能初步证明文中设计的探针具有一定的特异性.其特异性是否真正准确和该探针在实际应用中的价值还有待于进一步证实和大量的实践验证.

### [参考文献]

- [1] 刘维红,闫淑珍,刘五星,等. ACC脱氨酶活性细菌 XG32 的鉴定 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(2): 81-83
- [2] 刘维红,闫淑珍,杨启银,等. ACC脱氨酶活性细菌筛选及其对番茄初生苗生长的影响 [J]. 江苏农业科学, 2006(2): 80-84
- [3] 沈萍,闫淑珍,陈双林,等. 具 ACC脱氨酶活性的植物内生细菌对辣椒的促生作用和对疫霉病的防治作用 [J]. 植物保护学报, 2008(1): 28-32
- [4] 杨海莲,孙晓璐,宋未. 植物根际促生细菌和内生细菌的诱导抗病性的研究进展 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(2): 106-110
- [5] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1-30
- [6] deWeger L A, van der Bij A J, Dekkers L C, et al. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial *Pseudomonas* FEM S [J]. Microbiol Ecol, 1995, 17(4): 221-227.
- [7] Quadri H A, Kloepper J W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter axburiae* M22 in different plant species [J]. Can J Microbiol, 1996, 42: 1144-1156
- [8] Whitesides S K, Spotts R A. Frequency distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees [J]. Phytopathology, 1991, 81(4): 453-457.
- [9] 吴蔼民,顾本康,傅正擎,等. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 289-294
- [10] 刘云霞,张青文,周明. 电镜免疫胶体金定位水稻内生细菌的研究 [J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(4): 344-358
- [11] 冯娜,郑慧芬,何绍江,等. 用 *gfp* 基因检测饭豆根瘤菌在饭豆根部的定殖动态 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 49-51.
- [12] Kutter S, Hartmann A, Schmid M. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006(56): 262-271.
- [13] Lo Piccolo S, Ferraro V, Alfonso A, et al. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization [J]. Ann Microbiol, 2010(60): 161-167.
- [14] Dains H, Ramasingh N B, Schleifer K H, et al. Cultivation-independent semi-automatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(12): 5810-5818
- [15] Bond P L, Ehart R, Wagner M, et al. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non-efficient biological phosphorus removal activated sludge systems [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 4077-4084
- [16] 余利岩,徐平,姚天爵. 新型 *Actinobacteria* 荧光原位杂交 (FISH) 探针的设计和應用 [J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(6): 401-406

- [ 17 ] Hicks R E, Amann R I, Stahl D A, et al. Dual staining of natural bacterioplankton with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences[ J]. Appl Environ Microbiol 1992, 58( 7): 2 158-2 163.
- [ 18 ] Amann R I, Binder B J, Olson R J, et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations[ J]. Appl Environ Microbiol 1990, 56( 6): 1 919-1 925.
- [ 19 ] Manz W. In situ analysis of microbial biofilms by rRNA-targeted oligonucleotide probing[ J]. Meth Enzymol 1999, 310: 79-91.
- [ 20 ] Sanbrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[ M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 21 ] Rocheleau S, Greer C W, Lawrence J R, et al. Differentiation of methanosaeta concilii and Methanosarcina barkeri in anaerobic mesophilic granular Sludge by fluorescent in situ hybridization and confocal scanning laser microscopy[ J]. Appl Environ Microbiol 1999, 65( 5): 2 222-2 229.
- [ 22 ] Anderson M L M, Young B D. Quantitative filter hybridization[ M] // Hames B D, Higgins S J. Nucleic Acid Hybridization. Oxford: RL Press, 1985: 73-113.
- [ 23 ] Møller A, U B G bel. Fluorescence in situ hybridization(FISH) for direct visualization of microorganisms[ J]. Journal of Microbiological Methods 2000, 41: 85-112.

[ 责任编辑: 顾晓天 ]

( 上接第 88 页 )

AH 菌在鱼体血液及肝、脾、肾等组织中都存在, 病程多呈急性型, 来势猛, 爆发性死亡, 这就要求所选的药物口服后吸收良好且速度快便于药物迅速作用于病变组织<sup>[8]</sup>。中草药在鱼体内吸收相对较慢, 发挥作用的效应时间相对化学药物较长。在复方中草药中适量加入化学药物, 以快速杀灭致病菌, 同时通过中草药加强机体的免疫力和对损伤进行修复的作用<sup>[9, 10]</sup>, 达到标本兼治的效果。本试验提示化学药物中草药结合治疗细菌性疾病是一种可行的探索, 在水产养殖生产实践中有很好的指导意义。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 周群兰, 郑小平, 刘波, 等. 大黄提取物对嗜水气单胞菌的抑菌效果[ J]. 江苏农业科学, 2007, 2: 64-69.
- [ 2 ] 李小波, 黄文芳. 丰产鲫细菌性败血症的研究 I: 病原的分离与鉴定[ J]. 微生物学通报, 2003, 30( 5): 56-60.
- [ 3 ] 刘松岩, 向方华, 邹忠生. 常见中草药的药理作用及其在鱼病防治中的应用[ J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2001, 11( 3): 24-25.
- [ 4 ] 王海华. 中草药防治水产动物疾病及药理学研究进展[ J]. 中兽医学杂志, 2004( 4): 37-41.
- [ 5 ] 路振香, 谢文科. 八味中药提取物的体外抑菌试验[ J]. 中国兽医医药杂志, 2005( 3): 37-39.
- [ 6 ] 庞启华, 黄文芳, 谢凤. 丰产鲫细菌性败血症的血液病理变化[ J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10( 3): 315-317.
- [ 7 ] 艾晓辉, 左文功, 贺路. 淡水养殖鱼类细菌出血性败血病药物防治研究[ J]. 中国水产科学, 1997, 4( 3): 54-61.
- [ 8 ] 史成银, 朱心玲, 卢全章. 细菌性败血症引起鲫凝血障碍的研究[ J]. 水生生物学报, 1998, 22( 4): 367-371.
- [ 9 ] Harkrishnan R, Nisha Ranim, Balasundaram C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection[ J]. Aquaculture 2003, 221: 41-50.
- [ 10 ] 罗琳, 蔡雪峰, 成中芹. 5种常规中草药联用对鱼害粘球菌的药效研究[ J]. 西南农业大学学报, 2000, 22( 5): 463-465.

[ 责任编辑: 顾晓天 ]